

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-291100

(43) 公開日 平成9年(1997)11月11日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/47			C 0 7 K 14/47	
A 6 1 K 38/00			A 6 1 K 39/395	G
39/395				U
48/00	ABC		48/00	ABC
			C 0 7 H 21/04	B
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-102554

(22) 出願日 平成8年(1996)4月24日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年10月28日
日本免疫学会発行の「日本免疫学会総会・学術集会記録
第25巻」に発表

(71) 出願人 000002130

住友電気工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72) 発明者 前田 啓子

東京都八王子市緑町412番7号

(72) 発明者 佐藤 健志

埼玉県川口市西川口四丁目6番31号

(72) 発明者 清野 研一郎

東京都国分寺市西町二丁目28番1号202号

(72) 発明者 東 みゆき

東京都板橋区高島平八丁目16番8号

(74) 代理人 弁理士 上代 哲司 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラットCD86、その遺伝子及びその抗体

(57) 【要約】

【課題】 ラットCD86のアミノ酸配列、その遺伝子の塩基配列の決定、さらにはラットCD86抗体の獲得を課題とする。

【解決手段】 ラット細胞株からcDNAライブラリーを作成し、該ライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法を用いたスクリーニングを行って得られたクローンの塩基配列を決定し、ラットCD86遺伝子の塩基配列を決定した。そして、該塩基配列より、ラットCD86のアミノ酸配列を決定した。さらに、ラットCD86を発現しているラット細胞株をマウスに免疫し、該マウスの脾細胞を用いてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマからラットCD86抗体を得た。

```

ラットCD86: -----MGLAIIIFV TVLLISDAVS VETQAYFNET AYLPQPFKA QNISLSLVV
          KVVVKTCVTC THYLGIILSV LAYLLSDAVP VKRQAYFNET AYLPQPFKA QNISPSLVV
ラットCD86: M-----GLSNILF-V MAFLLSGAAP LKIQAYFNET ADLPQCFANS QNISLSLVV

59 : FNQOQKLVV YENYLGTEKL DSVNAKYLGR TSFDRKNWTL RLHNVQIKDN GSYDCFIQKK
61 : FNQORKKSVL YENYLGAEKL DNVNAKYLGR TSFDRDNQAL RLHNVQIKDT GLYDCFTQKK
58 : FNQOQENLVV NEVYLGKEKF DSVHVKYNGR TSFDSDSWTL RLHNLQIKDK GLYQCIINHK

110 : PPTGSIILQQ TLYELSVIAN FSEPEIKLAQ NVIGNSGINK TYSKQGHPK PKMYFL--I
121 : TPTGSIILQQ NETELSVIAN FSEPEIEEAQ NEIRNTGINK YCSSKQGYPK PTMYFL--I
110 : KPTGMIRIHQ MNSELSVIAN FSOPEIIVPIS NITENYVINK TCSSINGYPE PKMNSVLLRT

168 : TNSINEYGDN MQISQDNYTE LFSKSNLSL SFPDGVVHMT VVCLETESM KI-SSKPLN-
181 : TNSINEYGDN MQISQDNYTE LFSVSLSL SFPDGVVHMT VVCLETESM NI-SSKPHNM
170 : KNSILEYDGI MQKSQDNYTE LYDVSISLSV SFPDVTSMIT IFCILETDKT RLLSSPFSIE

226 : ET-DEFPSPQ TYNKE-IT-A SVTVALLLVN -LLITVCH-K KPNQPSRPSN TAS-KL----
241 : VFSQ----PQ FDRKTVIQIA GPSS-LLCLL FLLVYKAYK KCLKMNQHPG RFRRTTC---
230 : LED-----PQ PPPDH-IPWI TAVLPVYIIC MMVCLILNK WKKKRPRNS Y---K-CGTN

276 : -----ER-DS NADRETINK ELEPQIASAK PNAE
390 : -----ESKQD SGVDESINLE EPEQLHQQ
281 : TWREESSEQT KKR-EKIHIP ERSDEA-QRV FKSSKTS5CD KSDTCF

```

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特開平9-291100

(43) 公開日 平成9年(1997)11月11日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/47			C 0 7 K 14/47	
A 6 1 K 38/00			A 6 1 K 39/395	G
39/395				U
			48/00	A B C
48/00	A B C		C 0 7 H 21/04	B
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-102554

(22) 出願日 平成8年(1996)4月24日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年10月28日
日本免疫学会発行の「日本免疫学会総会・学術集会記録
第25巻」に発表

(71) 出願人 000002130

住友電気工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72) 発明者 前田 啓子

東京都八王子市緑町412番7号

(72) 発明者 佐藤 健志

埼玉県川口市西川口四丁目6番31号

(72) 発明者 清野 研一郎

東京都国分寺市西町二丁目28番1号202号

(72) 発明者 東 みゆき

東京都板橋区高島平八丁目16番8号

(74) 代理人 弁理士 上代 哲司 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラットCD86、その遺伝子及びその抗体

(57) 【要約】

【課題】 ラットCD86のアミノ酸配列、その遺伝子の塩基配列の決定、さらにはラットCD86抗体の獲得を課題とする。

【解決手段】 ラット細胞株からcDNAライブラリーを作成し、該ライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法を用いたスクリーニングを行って得られたクローンの塩基配列を決定し、ラットCD86遺伝子の塩基配列を決定した。そして、該塩基配列より、ラットCD86のアミノ酸配列を決定した。さらに、ラットCD86を発現しているラット細胞株をマウスに免疫し、該マウスの脾細胞を用いてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマからラットCD86抗体を得た。

```

マウス: ----- -MGLAIFV TVLLISDAVS VETQAYFNGT AYLPCTKA QNISSELYV
ヒト: MYVKTCTC THYLGLFSV LAYLLSDAVP VQRQAYFST AYLPCTKA QNISSELYV
ヒト: M----- -GLSNILF-V NAFLLSGAP LKIQAYFET ADLPQFAHS QNISSELYV

59 : FNQDQQLVL YHYLGTEKL DSVNAKYLGR TSFDRNNWTL RLHNQZKDN GSYDCFQKK
61 : FNQDQKSVL YHYLGAEKL DSVNAKYLGR TSFDRNQAL RLHNQZKOT GLYDCFQKK
58 : FNQDQENLVL NEVYLGEKF DSVNSKYLGR TSFDSNSWL RLHNQZKOK GLYCFIHHK

110 : PPTGSIILQQ TLTSLVIAN FSEPEIKLAQ NITGNSGILN TCTSKQHPK PKKNYFL--I
121 : TPTGSIILQQ NETELSVIAN FSEPEIEEAQ NETRMTGILN YC5SKQYPK PTKNYFL--I
110 : KPTGMIRINQ MNSLSVLAM FSOPEIYVPS NITENYVYILN YC5SINGYPE PKKNSVLRT
168 : TNSINEYGDN HQISQDQVTE LFSISMSLSL SFPGGVHMT VVCVLETESM KI-5SKPLN-
181 : TNSINEYGDN HQISQDQVTE LFSVSISLSL PFPGGVHMT IVCILETESM NI-5SKPHNM
170 : KNSIEFYDGI HQKSQDQVTE LYDVSISLSV SFPGVTSNMT IFCILETOKT RLSSPFSIE
226 : ET-DEFPSPQ TYNKE-IT-A SVTVALLVM -LLIVCH-K KPWQSPRPSH TAS-XL---
241 : VFSQ----PQ FDRKTIQIA GPSS-LLCLL FLLVYKAVK KCLKMQHPG RPERHTC---
230 : LED-----PQ PPPDH-IPWI TAVLPTVYIC MWFCLILMK WKKKKRPNRS Y---K-CGTN
276 : -----ER-DS NADRETINK ELEPQIASAK PNAE
300 : -----ESKQD SGVDESINLE EEPQLHQQ
281 : TMERESESEQT KKR-EKIHIP ERSDEA-QRV FKSKTSSCD KSOTCF

```

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドの一部を置換、欠失又は付加により構造的に改変した変異体であり、活性化B細胞の膜上で発現されT細胞に対して抗原シグナルの副次的シグナルを与えることを特徴とするポリペプチド。

【請求項3】 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する8個以上のアミノ酸を有し、且つ抗原性を有するポリペプチド。

【請求項4】 請求項1ないし3のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項5】 請求項4に記載のポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の全部又は一部の配列を有し、且つ請求項1ないし3のいずれか一項に記載のポリペプチドの生合成を阻害するアンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項4に記載のポリヌクレオチドの誘導体。

【請求項7】 請求項5に記載のアンチセンスポリヌクレオチドの誘導体であって、且つ請求項1ないし3のいずれか一項に記載のポリペプチドの生合成を阻害する機能を保持したアンチセンスポリヌクレオチド誘導体。

【請求項8】 請求項4ないし7のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドの連続する12塩基以上の一部であるポリヌクレオチド。

【請求項9】 請求項1ないし3のいずれか一項に記載のポリペプチドと反応する抗体。

【請求項10】 請求項1ないし3のいずれか一項に記載のポリペプチドと反応するモノクローナル抗体又はF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、組み換えFvもしくは一本鎖Fvのいずれかであるその活性フラグメント。

【請求項11】 CD86を介したT細胞の活性化を抑制することができる請求項10に記載のモノクローナル抗体又はF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、組み換えFvもしくは一本鎖Fvのいずれかであるその活性フラグメント。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ラットCD86、その遺伝子、そのアンチセンスポリヌクレオチド及びその抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】 T細胞と抗原提示細胞との相互作用は、多種類の細胞及び調節因子が複雑に相互作用することにより機能している。T細胞と抗原提示細胞間の接着の補助分子の組み合わせとして、LFA-1（T細胞表面に発現される）とICAM-1、ICAM-2又はICAM-3（抗原提示細胞表面に発現される）等が知られて

いる。これらの分子は、いずれもT細胞と抗原提示細胞の相互作用のみならず、白血球と標的細胞、組織又は血管内皮細胞との接着等においても広く機能している。これら接着分子の機能を解明することは、基礎医学の研究のみならず臨床面で極めて重要と考えられている。最近、上記分子の他に、従来は各種細胞に特異的な分化抗原であると考えられていたCD28-CD80の系が実は細胞間の相互作用に重要な役割を果たしていることが明らかにされた（J. Immunol. vol. 128 p. 823-827, 1982; J. Exp. Med. vol. 175 p. 353-360, 1992; J. Immunol. vol. 150 p. 2091-2101, 1993）。

【0003】 CD28陽性ヒト細胞株YT2C2は、ヒトB細胞株であるJYを*in vitro*細胞障害反応で殺すことが分かっている。この反応は抗CD28抗体により完全に阻害されるが、抗CD80抗体は部分的にこの反応を阻害するにすぎない。このことは、活性化B細胞表面にはCD80以外の、T細胞表面のCD28及びCTLA-4に結合性を持つ分子があり、それもまたT-B細胞間相互作用において重要な役割を果たしていることを示唆している。こうしたことから、CD28と結合するCD80以外の分子についての探索がなされた結果、抗原提示細胞（活性化B細胞）の膜上で発現され、T細胞に対して抗原からのシグナルに加えて第二の活性化シグナル、すなわち抗原シグナルの副次的シグナル（co-stimulatory signal）を与える分子であるB70（B7-2）という分子が発見された（Nature vol. 366 p. 76-79, 1993; Science vol. 262, p. 909-911, 1993）。その後、さらに解析が進み、このB70分子はCD86として同定された分子と同じであることが判明した（J. Exp. Med. vol. 180 p. 1841-1847; Blood vol. 84 p. 1402-1407, 1994）。ここに、CD86は抗原提示細胞上に抗原刺激前から発現している分子であり、抗原シグナルの副次的シグナルを与える分子であることが明らかとなった。

【0004】 一方、生体には、体外から侵入してきた異物を非自己と認識して、これを体外に排除し、生体の恒常性を維持しようとする免疫機構が備わっている。臓器等の移植においては、他の個体からの移植臓器は典型的な異物であり、生体の免疫機能による移植片拒絶反応を引き起こすことがよく知られている。しかし、治療としての移植を成立させるためには、免疫学的拒絶反応を回避して、移植臓器を生着させる必要がある。この免疫学的拒絶反応を特異的に又は非特異的に抑制するために、各種の免疫抑制法の研究開発が進められている。免疫応答で重要な役割を担うと考えられているCD86も免疫抑制の研究対象であるが、研究成果の実践のために

は、いずれにおいても、動物実験による検討を行った後、臨床へと検討が移る。従来CD86については生体外での反応で検討していたのみであり、臓器移植の拒絶等の生体内におけるCD86-CD28又はCTLA-4の機能がどう働いているかを調べるのには、動物実験による検討が急務となっていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】動物実験に用いる動物は、手術を行うために或る程度大きい動物であることが望ましい。また、解析のためには、当該動物に対する種々の抗体がそろっていることも必要である。本発明者はこれらの条件を満たす動物としてラットに着目した。しかしながらラットCD86については未だそのアミノ酸配列、その遺伝子の塩基配列が不明であり、ラットCD86抗体もなく動物実験に着手することも出来ない状況であった。そこで、本発明者は、本発明の課題をラットCD86のアミノ酸配列の決定、ラットCD86遺伝子の塩基配列の決定、さらにはラットCD86抗体の獲得として鋭意研究開発を続けてきた。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題の解決のために、ラット細胞株からcDNAライブラリーを作成し、該ライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法を用いてスクリーニングを行って得られたクローンの塩基配列を決定し、ラットCD86遺伝子の塩基配列を決定した。そして、該塩基配列より、ラットCD86のアミノ酸配列を決定した。さらに、ラットCD86を発現しているラット細胞株をマウスに免疫し、該マウスの脾細胞を用いてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマからラットCD86抗体を得た。

【0007】本発明は、下記の番号を付した各態様のものを提供する。

(1) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 上記(1)に記載のポリペプチドの一部を置換、欠失又は付加により構造的に改変した変異体であり、活性化B細胞の膜上で発現されT細胞に対して抗原シグナルの副次的シグナルを与えることを特徴とするポリペプチド。

(3) 上記(1)に記載のポリペプチドの一部を置換、欠失又は付加により構造的に改変した変異体であり、請求項1に記載のポリペプチドに反応する抗体が反応することを特徴とするポリペプチド。

(4) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する8個以上のアミノ酸を有し、且つ抗原性を有するポリペプチド。

【0008】(5) 上記(1)ないし(4)に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

(6) 上記(5)に記載のポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の全部又は一部の配列を有し、且つ上記(1)な

いし(4)のいずれか一項に記載のポリペプチドの生合成を阻害するアンチセンスポリヌクレオチド。

(7) 上記(5)に記載のポリヌクレオチドの誘導体。

(8) 上記(6)に記載のアンチセンスポリヌクレオチドの誘導体であって、且つ上記(1)ないし(4)のいずれか一項に記載のポリペプチドの生合成を阻害する機能を保持したアンチセンスポリヌクレオチド誘導体。

(9) 上記(5)ないし(8)のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドの連続する12塩基以上の一部であるポリヌクレオチド。

【0009】(10) 上記(1)ないし(4)のいずれか一項に記載のポリペプチドと反応する抗体。

(11) 上記(1)ないし(4)のいずれか一項に記載のポリペプチドと反応するモノクローナル抗体又はF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、組み換えFvもしくは一本鎖Fvのいずれかであるモノクローナル抗体の活性フラグメント。

(12) CD86を介したT細胞の活性化を抑制することができる上記(11)に記載のモノクローナル抗体。

(13) IgGクラスに属し、L鎖がγである上記(11)又は(12)に記載のモノクローナル抗体。

(14) 上記(11)ないし(13)のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【0010】(15) 上記(5)に記載のポリヌクレオチドが導入された発現ベクター。

(16) 上記(15)に記載の発現ベクターを導入した形質転換体。

(17) 上記(16)に記載の形質転換体によって発現される組み換えポリペプチド。

【0011】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。ラットは臓器移植や免疫応答のモデルとしては、非常に有用な動物である。その理由として、マウスでは小さすぎるため、実施不可能あるいは実施が非常に困難なために安定化しない実験系(例えば、心移植や小腸移植)もラットの大きさでは実施可能であること及び既述のように解析のための種々の抗体がそろっていることが挙げられる。

【0012】本明細書において、CD86はポリペプチドを表し、該ポリペプチドをコードする遺伝子はCD86遺伝子又はCD86 cDNAと表記する。該ポリペプチドに対する抗体は、CD86抗体と表記する。特に該ポリペプチドが由来する動物の種を明記する場合は、ラットCD86のように表記する。単にCD86と表記した場合は、それが由来する動物の種は問わない。また、遺伝子については、天然に存在するmRNAから逆転写により得たDNAという意味を明確にする場合cDNAと称する。

【0013】本発明のラットCD86は構造的には配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で表されるポリペ

プチドである。その分子量は、34 kDである。その主たる機能は、活性化B細胞の膜上で発現されT細胞に対して抗原シグナルの副次的シグナルを与えることである。

【0014】自然の変異により又は人工の変異（例えば、『Molecular Cloning 2nd Edition』（Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年）15.1～15.113頁を参照）によりポリヌクレオチドの構造の一部を、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの主たる機能の活性に変化を与えることなく、変化させることが可能である。本発明のラットCD86についても、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の一又は複数のアミノ酸を、該ポリペプチドの主たる機能である活性化B細胞の膜上で発現されT細胞に対して抗原シグナルの副次的シグナルを与えることを変化させずに、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列に置換、欠失又は付加することが可能である。これらを本発明ではラットCD86変異体という。

【0015】ラットCD86変異体は、後述するCD86の精製方法と同様にして得られ、SDS-PAGE電気泳動等の方法により検出可能である。ラットCD86が活性化B細胞の膜上で発現されT細胞に対して抗原シグナルの副次的シグナルを与えることは、T細胞をCD86遺伝子を導入した刺激細胞と混合してマイトジェン刺激を与えたときの該T細胞の増殖を測定することにより確認することができる。具体的には、実施例3で示す方法により好適に確認することができる。

【0016】遺伝暗号の縮重により、ポリヌクレオチドから生産されるポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく、該ポリヌクレオチドの塩基配列の少なくとも一部の塩基を他の種類の塩基に置換することができる。したがって、本発明のラットCD86及びラットCD86変異体をコードするポリヌクレオチドは、上記のポリペプチドをコードしうる全ての縮重のパターンを取り得る。なお、配列表の配列番号2に示される塩基配列は天然に存在するラットCD86遺伝子の塩基配列である。

【0017】配列表の配列番号2の塩基配列のうちの連続する12塩基以上の一部を有するDNA又は該DNAにハイブリダイズするポリヌクレオチドは、cDNAライブラリー等からラットCD86遺伝子をスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。このとき、GC含有率が30ないし70%のものが好適に使用可能である。また、連続する16塩基以上であるDNA又は該DNAにハイブリダイズするポリヌクレオチドが特に好ましい。プローブとして用いる該ポリヌクレオチドは誘導体であってもよい。使用するcDNAライブラリーとしては、ラット細胞株のmRNAから作製されたものが好ましく使用できる。これらのcDNAライブラリーからランダムサンプリングにより選択された一群の

cDNAを検索の試料とすることができる。また、市販のものでも使用可能である。

【0018】さらに、スクリーニングの際にプラスミドを得る方法についても、特に制限はなく、公知の方法により可能である。例えば、『細胞工学実験プロトコル』（秀潤社、1991年）71～107頁に記載の方法が挙げられる。また、ヘルパーファージを用いたin vivo excision法（例えば、ストラタジーン社のUni-ZAP XRクローニングキット（登録商標）取扱説明書に記載の方法）にしたがってプラスミドの形に変換することが好ましい。

【0019】上記により得られるプラスミドのインサートの塩基配列を決定することで、ラットCD86をコードするcDNAが選択可能となるが、本発明では、そのインサートの一部又は全部を解析するかどうかについては、特に制限はない。適当な長さの塩基配列を決定し、その結果に基づきさらに適当なプラスミドを選択することも好ましく可能である。本発明においては、5'末端のいくつかの塩基配列を決定し、該決定された塩基配列がコードするアミノ酸を予測し、この結果に基づいてさらにプラスミドを選択することが好ましい。この場合、インサートの5'末端は少なくとも200塩基以上は解析されることが好ましい。解析されたプラスミド（特に制限はなく、例えばランダムに適当な数を選択することが可能である。）の5'末端の塩基配列の決定方法は、本発明においては、特に制限ない。例えば、Taqサイクルシーケンシング法（『Biotechniques vol. 7』（1989年）494～499頁に記載の方法は好ましく使用可能である。

【0020】得られた塩基配列から翻訳されるアミノ酸配列と、ラットCD86のアミノ酸配列との比較方法については、特に制限がない。例えば、市販のプログラム（例えば、GENETYX（登録商標）-CDプログラムVer. 27（ソフトウェアディベロプメント社製）により、プロテインデータベース（登録商標）リリース43（NBRF社製）と比較してホモロジー解析することが可能である。このホモロジー解析の結果、例えば、連続する100残基において30%以上のホモロジーがあるものを選択することが可能となる。

【0021】選択されたアミノ酸配列をコードするcDNAに基づき、コード領域全体を含むクローンを単離するためのスクリーニング方法については特に制限がない。該塩基配列の一部又は全部を利用するかどうかは特に制限はなく、この該塩基配列を利用してスクリーニング可能であればよい。例えば、上記で得られた塩基配列の約半分の塩基配列を利用することも可能である。これは、使用するスクリーニング方法にも依存する。スクリーニング方法については、公知の種々の方法が好適に使用可能であり、特に制限はない。例えば、ラベル化したオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションに

よる方法や、5' 方向又は3' 方向のプライマーを用いたRACE法等が使用可能である。上記ラベル化については特に制限なく、例えば、 $[\alpha-^{32}\text{P}] \text{dCTP}$ 、ジギシゲニン等が使用可能である。さらに、ハイブリダイゼーションの条件についても、本発明においては、特に制限なく、公知の種々の方法が使用可能であり、例えば、『細胞工学実験プロトコル』（秀潤社、1991年）57～65頁に記載の方法が好適に使用可能である。

【0022】上記でスクリーニングされたポジティブクローンから、該インサートの塩基配列を決定するための方法については、本発明においては、特に制限はなく、公知の方法により種々可能である。例えば、欠変異株を作製し、個々のクローンの塩基配列を決め、該配列を配列編集ソフト上で連結する方法が使用可能である。

【0023】プラスミドを大腸菌等の適当な宿主に導入して、形質転換体を得ることは公知の方法により可能である。例えば、『細胞工学プロトコル』（秀潤社、1991年）105～107頁に記載の方法により可能である。形質転換体やそれに導入する組み換えDNAの好ましい形態については、例えば、国際出願公開番号WO95/13293（国際特許出願PCT/JP94/01899）の明細書に記載されているものが挙げられる。

【0024】得られた形質転換体を培養し、遺伝子の増幅、発現を行いラットCD86を製造することが可能である。次に培養物を回収し、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、各種クロマトグラフィー等の操作を行うことによりラットCD86を精製することが可能である。形質転換体の培養については、各種の成書があり、例えば、『微生物実験法』（社団法人日本生化学会編、東京化学同人、1992年）に記載の方法で行うことが可能である。ラットCD86を発現させることも、公知の方法により可能である。このとき、宿主としては、大腸菌等の細菌、酵母、動物細胞のいずれも使用可能である。特に、動物細胞が好ましい。細胞に遺伝子を導入するには、リボソーム法、エレクトロポレーション法等を用いることができる。特に、DEAE-デキストラン法（ファルマシア社製）を用いることが好ましい。

【0025】得られた培養物からラットCD86を精製する精製方法には、免疫沈降法、塩析法、限外濾過法、等電点沈降法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーや抗体クロマトグラフィー等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィー法及び逆相クロマトグラフィー等があり、適宜選択して行えばよい。例えば、国際公開番号WO95/06738の明細書39頁に示されている免疫沈降法は好適な方法である。また、製造段階において、製造するラットCD86は、他のポリペプチドとの融合ペプチドと

して形質転換体に生産させてもよい。この場合は、精製工程において、ブロムシアン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理して、該ラットCD86を切り出す操作が必要になる。

【0026】本発明のラットCD86アンチセンスポリヌクレオチドには、塩基、リン酸、糖からなるヌクレオチドが複数結合したものが、天然には存在しないものを含めて全て含まれる。その代表的なものは、DNAとmRNAである。また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド誘導体には、その立体構造や機能がポリヌクレオチドと類似するものが全て含まれる。例えば、ポリヌクレオチドの3' 末端もしくは5' 末端に他の物質が結合したものやポリヌクレオチドの塩基、糖、リン酸の少なくともいずれか一部において、置換や欠失や付加の修飾が生じた物質、天然に存在しないような塩基、糖、リン酸を有するものや、糖-リン酸骨格以外の骨格を有するものである。該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体は、ラットCD86又はラットCD86変異体をコードするポリヌクレオチドのいかなる部分にハイブリダイズするものであってもよい。なお、ラットCD86又はラットCD86変異体の全部又は一部をコードするmRNAの一部に対して相補的な塩基配列を有し、該mRNAにハイブリダイズするものが好ましい。特に好ましくは、少なくともラットCD86もしくはラットCD86変異体をコードするmRNAにハイブリダイズするものである。

【0027】また、該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体は、組織や細胞におけるラットCD86又はラットCD86変異体をコードするポリヌクレオチドの存在やその発現状況を調べるための研究用ポリヌクレオチドプローブとして、直ちに使用可能である。また、診断用ポリヌクレオチドプローブとしても使用可能である。なお、プローブとしては、12塩基以上且つGC含有率が30ないし70%であるものが好ましく、16塩基以上且つGC含有率が30ないし70%であるものが、特に好ましい。また、該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体を使用して、ラットCD86又はラットCD86変異体の発現を調節することが可能である。これらはラットCD86もしくはラットCD86変異体をコードする遺伝子もしくはmRNAにハイブリダイズしてラットCD86又はラットCD86変異体の発現を抑制することが期待されるので、ラットCD86又はラットCD86変異体が関与する機能の異常に基づく疾患の治療薬として使用可能である。すなわち、該アンチセンスポリヌクレオチドやその誘導体よりアンチセンス医薬品を開発することが可能である。

【0028】ポリペプチドをコードするDNAやmRNAの相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを使用して、該ポリペプチドの発現を調節する方法は、アンチセンス法と呼ばれており、現在多くの研究者によって研究

が進められている技術である。相補的な配列を有するポリヌクレオチドは、

①遺伝子からpre-mRNAへの転写段階、

②pre-mRNAから成熟mRNAへのプロセッシング段階、

③核膜通過段階、

④蛋白への翻訳段階

のいずれかで、遺伝情報を担うDNA又はmRNAに結合し、遺伝情報の伝達の正常な流れに影響を与えてポリペプチドの発現を調節すると考えられている。ハイブリダイズのし易さの点では、一般的には、ステムループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列を持つポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を設計するとよいとされている(『臨床免疫 25巻』1200~1206頁、1993年)。

【0029】また、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の配列に相補的な配列を有するようなポリヌクレオチドは、一般に高い発現抑制効果が期待できる(『癌と化学療法 20巻13号』1899~1907頁)。したがって、本発明のポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体であって、ラットCD86又はラットCD86変異体をコードする遺伝子又は該遺伝子に対するmRNAの翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の相補的な配列を含むものは、高い発現抑制効果が期待される。現在一般に知られている誘導体の例は、『国際出願公開番号WO95/13293』

(国際特許出願PCT/JP94/01899)に示されている。また、該出願には、当該誘導体は、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも1つが高められた誘導体であることが好ましく、特に好ましくは、当該ポリヌクレオチド誘導体は、フォスフォロチオエート結合を骨格構造として有する誘導体であることが示されている。本発明のポリヌクレオチド及びその誘導体についても、これらの機能又は構造を有する誘導体が含まれる。

【0030】本発明のアンチセンスポリヌクレオチド誘導体の製造方法については、例えば、『国際出願公開番号WO95/13293』(国際特許出願PCT/JP94/01899)や『in Antisense Research and Applications』に記載の方法を用いることが可能である。例えば、天然型のDNAやRNAであれば、化学合成機を使用して合成したり、ラットCD86又はラットCD86変異体をコードする遺伝子を鋳型とするPCR法により本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを得ることができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型等、誘導体の中には、化学合成機(例えば、パーキンエルマージャパン社製394型)を使用して合成できるものもある。この場合には、化学合成機に添付されて

いる説明書にしたがって操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することによっても、目的のポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を得ることができる。

【0031】本発明のラットCD86抗体は、本発明のラットCD86と反応する限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれも含まれる。また、その活性フラグメント及び活性フラグメントを含むキメラ抗体も含まれる。抗体、すなわち免疫グロブリンは、H鎖とL鎖を持ち、物理化学的性質や免疫学的性質から5つのクラス(IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、)に分けられる。このうち、IgA、IgGはH鎖のタイプによってさらにサブクラスに分けられる。本発明の新規抗体は、これらの全てのクラス、サブクラスに属するものを含む。さらに、本発明の抗体は、必ずしも抗体分子全体を用いる必要はなく、活性を有する限り、分子の一部(活性フラグメント)を用いることができる。活性フラグメントとしては、具体的にはF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、組み換えFv体及び一本鎖Fvを挙げることができる。例えば、ペプシンで分解するとF(ab')₂、Fc'が得られ、パパインで分解するとFab、Fcが得られる。

【0032】これらの活性フラグメントは、単独でも用いられるが、必要に応じて、アルブミン、ポリエチレングリコール等の物質と結合させ、新たな複合物として用いることができる。このような複合物は、一般に、生体内では、長時間分解されずにその効果を最大限まで発揮することが多い。活性フラグメントに、アルブミン、ポリエチレングリコール等の物質を付加する方法は、例えば、『Antibodies, A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)p. 77-81、p129-137に記載されている。一般的には、SPDP(ファルマシア社製)、SMPB(ピアス社製)、EMCS(ドータイト社製)等の2価反応性試薬を用いれば、活性フラグメントをアルブミン等と容易に結合させることができる。

【0033】本発明のラットCD86抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であっても、公知の方法によって得ることが可能である。例えば、『免疫実験操作法』(日本免疫学会編、日本免疫学会発行)を参考にして得ることができる。免疫抗原としては本発明のラットCD86の一部、すなわち配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する8個以上のアミノ酸からなるポリペプチドであればよい。また、それが抗体の作製に使用しうる精製度のものであれば、該ラットCD86が得られた方法は問わない。免疫抗原が、8ないし約20個のアミノ酸からなるポリペプチドである場合には、それをキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)等のキャリアと結合させて抗原として使

用すればよい。該免疫抗原を免疫する動物はヒト以外のいずれでもよく、通常当業者で使用される動物から目的の抗体を産生し得る動物種を選択して使用することが好ましい。なお、本発明のラットCD86に対する抗体はラット以外の動物に免疫することが好ましい。

【0034】ポリクローナル抗体は、得られた抗血清を精製することによって得られる。精製は、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の方法を組み合わせて行えばよい。

【0035】モノクローナル抗体は、ハイブリドーマを作製する方法によって得られる。細胞融合には、ポリエチレングリコール、センダイウィルス、電気パルス等を用いる手法が使用可能である。また、上記以外に、遺伝子工学的な方法を用いても該モノクローナル抗体が得られる。例えば、本発明のラットCD86又はその一部で免疫した動物の脾細胞、リンパ球又は該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマからmRNAを採取し、これをもとにcDNAライブラリーを作製する。次に、該cDNAライブラリーにより抗体を発現させる。抗原と反応する抗体を産生するクローンをスクリーニングによりcDNAライブラリーから得、得られたクローンを培養し、培養混合物から目的とする抗体を、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の方法を組み合わせて精製することができる。

【0036】本発明の抗体は、ラットの活性化B細胞などの細胞に存在する本発明のラットCD86、ラットCD86変異体又はそれらの一部の検出に用いることができる。また、本発明のラットCD86、ラットCD86変異体又はそれらの一部を精製するために使用する抗体カラムの作製、各分画中の該ラットCD86、ラットCD86変異体又はその一部の検出のために用いることができる。

【0037】

【実施例】以下に実施例を示し、本発明を詳細に説明するが、本発明は本実施例に限定されるものではない。

1. ラット細胞株からのpolyA RNAの単離
ラット細胞株であるLewis-S1（北海道大学医学部吉木教授から譲受）からmRNAの集団であるpolyA RNAの取得を行った。具体的には、Lewis-S1細胞を75cm² フラスコを用い、10%FCS RPMI 1640培養液で1×10⁷ 個の細胞を培養した。この細胞を回収後、グアニジン法によりRNAの抽出を行った。このRNAに関し、オリゴdTカラムを用いてmRNAを精製した。

【0038】2. cDNAライブラリーの作製とスクリーニング

1) 上記1. で作製したmRNAをもとにオリゴdTとランダムヘキサマー（N6（ファルマシア社製））をプライマーとしてcDNAを合成した。具体的には、ZA

P-cDNA（登録商標）合成キット（ストラタジーン社製）を用いてcDNAにした。このcDNAについて酢酸カリウム5-20%の液を用いて遠心分離を行い、1-4kbの長さのcDNAを回収した。このcDNAについてGigapack（登録商標）II gold（ストラタジーン社製）を用いてcDNAライブラリーを得た。このcDNAライブラリーについて電気泳動を行ったところ、約120万の独立したクローンから構成されていることが判明した。

【0039】2) 次に、cDNAライブラリーのスクリーニングのために、マウスのCD86のcDNAのフラグメントについてランダムプライマー法を用いて、³²Pでラベルしたプローブを作製した。該プローブを用いてcDNAライブラリーについてブランクハイブリダイゼーション法を用いてスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、下記の反応液を用い55℃で16時間行った。

20×SSPE（3M NaCl、200mMリン酸ナトリウム（pH7.4）、20mM EDTA）・・・15ml

50×デンハルト液（1%牛アルブミン、1%Fico 11400、1%ポリビニルピロリドン）・・・2ml
10%SDS・・・2.5ml

10mg/ml 子牛胸腺DNA・・・0.5ml

DDW・・・30ml

ハイブリダイゼーション後、1×SSPE及び0.1% SDSの洗浄液を用いて55℃で10分間、4回洗浄した。上記方法により、2. の1) で作製したcDNAライブラリーから約4.8×10⁶ 個のクローンをスクリーニングした。

【0040】3. DNA塩基配列の決定

2. のスクリーニングで得られたクローンについて蛍光プライマーによるジデオキシ法を用いてDNAシーケンサー373A（アプライドバイオシステム社製）で解析し、塩基配列を決定した。該塩基配列を配列表の配列番号2に示す。得られたラットCD86のcDNAは975塩基対であった。なお、該cDNAを導入した大腸菌を工業技術院生命工学工業技術研究所に平成8年4月19日に寄託した（受託番号：FERM P-15586）。

【0041】4. アミノ酸配列の決定

得られたラットcDNAがコードするポリペプチド（ラットCD86）のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。また、ラットCD86とマウスCD86及びヒトCD86とのアミノ酸配列を対比させた図を図1に示す。図1中、ダッシュ（-）で示した部分は、対比のために配列を整列させることにより生じた表記上の空白である。ラットCD86は、全長で313個のアミノ酸からなり、分子量は34kDである。詳しくは、N末端から29個のアミノ酸からなるシグナルペプチド、N末端

から30番目ないし247番目の218個のアミノ酸からなる細胞外ドメイン、N末端から248番目ないし268番目の21個のアミノ酸からなるトランスメンブレンドメイン、N末端から269番目ないし313番目の45個のアミノ酸からなる細胞内ドメインからなる。また、コンピューター解析の結果からNグリコシド結合(糖鎖結合)の可能性のあるサイトが8カ所(図1中下

線を付した箇所)、PKCホスホリレーションサイト(シグナル伝達においてリン酸化される部位、図1中枠で囲った部位)が1カ所ある。全長及び各ドメインにおけるラットCD86とマウスCD86のホモロジー及びラットCD86とヒトCD86とのホモロジーを表1に示す。

【表1】

	シグナル ペプチド	細胞外 ドメイン	トランスメンブレン ドメイン	細胞内 ドメイン	全長
ラットCD86-マウスCD86	31.0%	78.8%	19.0%	35.3%	64.6%
ラットCD86-ヒトCD86	34.5%	57.9%	26.1%	19.4%	46.9%

【0042】<実施例2>ラットCD86に対する抗体
1. 免疫
免疫は、ラットCD86遺伝子のクローニングに用いた細胞株Lewis-S1を用いて免疫を行った。免疫方法は、Lewis-S1 1×10^7 個を1mlのPBSにサスペンドした後、polyA U 100 μ gを混合し、合計1.1mlをBalb/cマウスの腹腔内に注射した。週1回同様の免疫を行い、合計4回免疫した。

【0043】2. 細胞融合
最終免疫4日後に、上記マウスから脾臓を取り出した。取り出した脾臓を細断後、メッシュで濾過し、RPMI 1640培地に浮遊させ、脾細胞を 6×10^7 個得た。この脾細胞とマウス由来の8-アザグニン耐性株(ヒポキサンチン/アミノプテリンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損株)P3U1(1×10^7 個)とを混合し(約6:1の割合)、遠心した(1500rpm、5分)。得られた細胞のペレットに、50%ポリエチレングリコール4000(メルク社製)/RPMI 1640溶液3mlを、37℃の湯浴で攪拌しながら1分間を要して加えた後、さらに1.5分間攪拌した。これにRPMI 1640液10mlを攪拌しながら3分間を要して加え、さらにRPMI 1640液12mlを攪拌しながら1分間を要して加え、細胞融合を行った。細胞融合後、大量(25ml)のHEPES-RPMI 1640液を加え、1500rpmで5分間遠心分離して上清を除去し、その沈殿物にヒポキサンチン(100 μ M)、アミノプテリン(0.4 μ M)、チミジン(10 μ M)を含む10%FCS-RPMI 1640培地(HAT培地)1mlをのせ、37℃、CO₂ インキュベータ内で、30分間静置後、脾細胞が 1×10^6 個/mlになるようにHAT培地で細胞浮遊液を調製した。

【0044】3. ハイブリドーマの選択
上記2. で調製した細胞浮遊液を96ウェルマイクロプ

レート3枚に200 μ lずつ分注し、該プレートを37℃、5%CO₂ 下にあるCO₂ インキュベータ内に静置し、該プレートの細胞を培養した。1週間の培養後、ハイブリドーマのみが増殖し、コロニーを形成していることが確認された。

【0045】4. 抗体の検出

ハイブリドーマが分泌する抗体とCD86との反応の確認を以下の方法で行った。

1) 遺伝子導入細胞の調製

実施例1の2. の1) で得られたラットCD86 cDNAを5'末端側のHindIIIと3'末端側のNotIの位置で制限酵素で分解した。その後、アガロース電気泳動を行い、ラットCD86 cDNAを切り出した。このcDNAについてpCR/CMV(インビトロジェン)ベクターに組み入れた。このプラスミドpRC/CMV-CD86について大腸菌に導入し、プラスミドを大量に発現させた後、該プラスミドを回収した。回収したプラスミドpRC/CMV-CD86をCHO細胞(ATCC CCL61)に導入した。該細胞を抗生物質G418(1mg/ml)存在下の10%FCS-RPMI 1640培地で培養した。生存してきた細胞について、ラットCD86に対するノーザンブロット法を行い、ラットCD86 cDNAの発現を確認した。確認できた細胞をラットCD86導入CHO細胞とし、以降これを用いることとした。

【0046】2) 抗原抗体反応

ラットCD86導入CHO細胞及びCHO細胞をそれぞれ75cm² のフラスコで培養した。その後、両者をそれぞれ 1×10^6 個/mlで96ウェルU底プレート3枚に100 μ lずつ分注した。次に、ハイブリドーマの培養上清を50 μ lずつそれぞれに分注し、4℃にて30分間反応させた。

3) 標識二次抗体との反応

反応後、1000rpmで2分間遠心分離し、上清を除

去した。次に、PBSを各ウェルに200 μ lずつ加え、よく攪拌した後に1000rpmで2分間遠心分離し、上清を除去した。その後、FITC標識抗マウスIgG10 μ l/mlを各ウェルに100 μ lずつ加え、よく攪拌した後、4℃で30分間反応させた。反応後、1000rpmで2分間遠心分離し、上清を除去した。次に、PBSを各ウェルに200 μ lずつ加え、よく攪拌した後に1000rpmで2分間遠心分離し、上清を除去した。その後、PI（プロピディウムイオダイド）50 μ l/mlを含むPBSを200 μ lずつ各ウェルに加えた。

【0047】4) FACSscan測定

上記3)で調製した液をFACSscan（登録商標、ベクトンディッキンソン社製）にて測定した。結果を図2に示す。図2に明らかなように、ラットCD86導入CHO細胞と反応させたハイブリドーマの培養上清にピークのズレが見られるものがあり、該培養上清にはCD86と反応する抗体が存在することが確認された。なお、ラットCD86と反応する抗体（抗ラットCD86抗体C2C）を産生するハイブリドーマを、Hybridoma C2Cと名付け、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成8年4月19日に寄託した（受託番号：FERM P-15587）。

【0048】5. クローニング

上記4. の4)で抗体の存在が確認された培養上清の取ったウェルで増殖しているハイブリドーマを限界希釈法でクローニングした。希釈後の濃度が1個/ウェルとなるように10%FCS・RPMI1640培地でハイブリドーマを希釈し、96ウェルプレートに200 μ lずつ分注し、37℃、5%CO₂下で培養した。約1週間後に、ハイブリドーマの増殖が認められた。この培養上清について、上記4. の抗体の検出に記載した方法で再度抗体の検出を行った。抗体の存在を確認した後、限界希釈法の操作を2回繰り返して、安定にCD86と結合する抗体を産生するクローンを選択した。

【0049】<実施例3> マイトジェン刺激によるT細胞の増殖におけるラットCD86の役割と抗ラットCD86抗体によるその抑制効果の検討

抗原刺激を模倣した各種マイトジェン刺激によるT細胞の増殖にラットCD86が与える影響及び該影響における抗ラットCD86抗体の抑制効果を検討した。

1. マイトジェン刺激によるT細胞の増殖におけるラットCD86の役割

1) Lewisラットから脾臓を摘出した後、メスで細断し、メッシュを通して単細胞浮遊液（single cell suspension）を調製した。具体的には以下のプロトコールで行った。

(1) ナイロンウール（和光純薬製）0.5gに水を充分含浸させ、該ナイロンウールを10mlのシリンジに詰め、ナイロンウールカラムとした。シリンジの先端に

は18Gの注射針を着けた。

(2) PBS 30mlでナイロンウールカラムを洗浄した。

(3) 該ナイロンウールカラムを121℃、20分間オートクレーブ滅菌した。

(4) 血清不含のRPMI1640培地30mlをナイロンウールカラムに流し、次いで、10%FCS・RPMI1640培地を30ml流した後、該ナイロンウールカラムを37℃で保管した。

【0050】(5) Lewisラットから脾臓を摘出した後、メスで細断し脾細胞とした。該脾細胞が5 \times 10⁷個/mlとなるように、2.5mlの10%FCS・RPMI1640で浮遊液とし、該浮遊液を37℃まで加温した。

(6) (4)で調製したナイロンウールカラムに(5)のラット脾細胞浮遊液をアプライした。

(7) ラット脾細胞液が全てナイロンウールカラムに浸透したことを確認し、ナイロンウールカラムを37℃で1時間放置した。

(8) 1時間放置後、ナイロンウールカラムに10%FCS・RPMI1640培地10mlを加え、T細胞画分を溶出させた。

(9) 該画分の細胞を回収して、1 \times 10⁶個/mlになるように10%FCS・RPMI1640培地で細胞浮遊液を調製し、該浮遊液中の細胞を応答細胞（responder cell）として以降に用いた。

【0051】2) CD86遺伝子導入CHO細胞を以下のプロトコールで処理し、刺激細胞（stimulator cell）とした。

(1) CD86遺伝子導入CHO細胞培養液について細胞数を計測し、1 \times 10⁷個の細胞を含むだけの細胞培養液を取り、1500rpmで5分間遠心分離し、細胞をペレットにした。該ペレットにマイトマイシンC（協和発酵社製）（50 μ g/ml）液を1ml加え、37℃で60分間インキュベートした。

(2) 10%FBS・RPMI1640培地を10ml加え、その後、1500rpmで15分間遠心分離した。その後、上清を除去し、再度10%FBS・RPMI1640培地を10ml加え、1500rpmで15分間遠心分離した。この遠心分離操作（遠心洗浄操作）をさらに5回繰り返した。

【0052】3) 応答細胞と刺激細胞を混合し、抗原刺激によるラットCD86の役割について以下の各条件で検討した。

A: PHA 2 μ g/ml存在下での刺激

B: 抗CD3抗体（5 μ g/ml）固相プレートでの刺激

C: PMA（5 μ g/ml）存在下での刺激

D: 未刺激

なお、Bの抗CD3抗体の固相は、反応を行う前日に、

5 μ g/mlの抗CD3抗体を24ウェルプレートの各ウェルに1mlずつ入れ、4℃で1日間放置した後、上清を捨てることによりプレート底面に抗CD3抗体を固相するという処理を行ったものである。

【0053】A、B、C、D各条件で、

①刺激細胞1ml/ウェル、②応答細胞1ml/ウェル、③各刺激液100 μ l/ウェルを①、②、③の順にいれ、37℃で4日間培養した。培養終了18時間前（培養開始後78時間経過時点）に、培養プレートの各ウェルに³H-チミジンを1 μ Ciずつ入れて、細胞に³H-チミジンを取り込ませた。培養終了後、細胞を回収し、細胞内の³H-チミジンの量を液体シンチレーションカウンターで測定した。結果を図3中、noneと示されたグラフに示す。図3でnone（CD86導入CHO細胞と混合させたもの）のグラフとresponder（CD86導入CHO細胞と混合させていないもの）のグラフを比較して、noneすなわちCD86導入CHO細胞と混合させたものは³H-チミジンの取り込みが多いこと、すなわちDNAの合成がさかんであり増殖していることが分かる。

【0054】2. 抗ラットCD86抗体の抑制効果
1) 1. の1) で作製した応答細胞液に抗ラットCD86抗体C2C又はヒトCTLA4Igを10 μ g/mlになるように添加した。なお、CTLA4IgはCTLA4にIgGのFcを結合させたものであり、抗CD8

6抗体と同じような作用があることが知られている。

【0055】2) 1. の2) 以降と同様に、応答細胞と刺激細胞とを混合し、抗ラットCD86抗体C2Cの抑制効果を調べた。4日間の培養の結果を、図3に示す。図3のグラフの縦軸は、回収した細胞内の³H-チミジンの量を表す。図3に示すように、抗体無添加（none）の場合、抗原刺激を模倣した各種マイトジェン刺激により、強い³H-チミジンの取り込みが認められた。また、抗ラットCD86抗体C2Cの添加により、³H-チミジンの取り込みがCTLA4Igよりも強く阻害されることが確認された。

【0056】

【発明の効果】本発明により、免疫応答で重要な役割を担うと考えられているCD86の動物実験による検討が可能となり、新規な免疫抑制法及びそれによる臓器移植治療を提供を可能とする。

【0057】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：313

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

```

Met Tyr Val Val Lys Thr Cys Val Thr Cys Thr Met Tyr Leu Gly Ile
1           5           10          15
Leu Phe Ser Val Leu Ala Tyr Leu Leu Ser Asp Ala Val Pro Val Lys
20          25          30
Arg Gln Ala Tyr Phe Asn Ser Thr Ala Tyr Leu Pro Cys Pro Phe Thr
35          40          45
Lys Ala Gln Asn Ile Ser Pro Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp
50          55          60
Arg Lys Lys Ser Val Leu Tyr Glu His Tyr Leu Gly Ala Glu Lys Leu
65          70          75          80
Asp Asn Val Asn Ala Lys Tyr Leu Gly Arg Thr Ser Phe Asp Arg Asp
85          90          95
Asn Gln Ala Leu Arg Leu His Asn Val Gln Ile Lys Asp Thr Gly Leu
100         105         110
Tyr Asp Cys Phe Ile Gln Gln Lys Thr Pro Thr Gly Ser Ile Ile Leu
115         120         125
Gln Gln Trp Glu Thr Glu Leu Ser Val Ile Ala Asn Phe Ser Glu Pro
130         135         140
Glu Ile Glu Glu Ala Gln Asn Glu Thr Arg Asn Thr Gly Ile Asn Leu
145         150         155         160
Thr Cys Ser Ser Lys Gln Gly Tyr Pro Lys Pro Thr Lys Met Tyr Phe
165         170         175
Leu Ile Thr Asn Ser Thr Asn Glu Tyr Gly Asp Asn Met Gln Ile Ser
180         185         190

```

Gln Asp Asn Val Thr Lys Leu Phe Ser Val Ser Ile Ser Leu Ser Leu
 195 200 205
 Pro Phe Pro Asp Gly Val Tyr Asn Met Thr Ile Val Cys Ile Leu Glu
 210 215 220
 Thr Glu Ser Met Asn Ile Ser Ser Lys Pro His Asn Met Val Phe Ser
 225 230 235 240
 Gln Pro Gln Phe Asp Arg Lys Thr Trp Ile Gln Ile Ala Gly Pro Ser
 245 250 255
 Ser Leu Leu Cys Cys Leu Phe Leu Leu Val Val Tyr Lys Ala Val Lys
 260 265 270
 Lys Cys Leu Lys Met Gln Asn Gln Pro Gly Arg Pro Ser Arg Lys Thr
 275 280 285
 Cys Glu Ser Lys Gln Asp Ser Gly Val Asp Glu Ser Ile Asn Leu Glu
 290 295 300
 Glu Val Glu Pro Gln Leu His Gln Gln
 305 310

【0058】配列番号：2

配列の長さ：942

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

ATG TAT GTC GTC AAG ACA TGT GTA ACC TGC ACC ATG TAC TTG GGA ATC	48
CTT TTC TCG GTG TTG GCC TAT CTG CTC TCA GAT GCT GTT CCT GTG AAG	96
AGG CAA GCT TAC TTC AAT AGC ACT GCA TAC CTG CCG TGC CCG TTC ACA	144
AAG GCT CAA AAC ATA AGC CCG AGT GAG CTC GTA GTA TTT TGG CAG GAC	192
CGG AAA AAG TCG GTT CTG TAC GAA CAC TAT TTG GGC GCA GAG AAA CTT	240
GAT AAC GTG AAT GCC AAG TAC CTG GGC CGC ACA AGC TTT GAT AGG GAT	288
AAC CAG GCT CTA CGA CTT CAC AAT GTT CAG ATC AAG GAC ACG GGC TTG	336
TAT GAT TGT TTT ATA CAG CAA AAG ACA CCC ACG GGA TCA ATT ATC CTC	384
CAG CAG TGG GAA ACA GAG CTC TCA GTG ATC GCC AAC TTC AGT GAA CCT	432
GAA ATA GAG GAG GCT CAG AAT GAA ACA AGA AAC ACT GGC ATA AAT TTG	480
ACC TGC TCA TCT AAG CAA GGA TAC CCG AAA CCT ACA AAG ATG TAT TTT	528
TTG ATA ACT AAT TCA ACT AAT GAG TAT GGC GAC AAC ATG CAG ATA TCA	576
CAA GAC AAT GTC ACA AAG CTG TTC AGT GTC TCC ATC AGC CTA TCT CTT	624
CCA TTC CCG GAT GGG GTG TAC AAT ATG ACC ATT GTG TGT ATT CTG GAA	672
ACG GAG TCA ATG AAT ATT TCC TCC AAA CCT CAC AAT ATG GTT TTT TCG	720
CAG CCC CAG TTT GAT CGA AAG ACT TGG ATC CAG ATT GCA GGT CCC AGT	768
TCA CTT CTG TGC TGT CTC TTT CTG CTG GTC GTC TAC AAA GCA GTC AAA	816
AAG TGT TTG AAG ATG CAG AAC CAG CCC GGC AGA CCC AGC AGA AAG ACT	864
TGT GAG TCC AAG CAG GAC AGT GGT GTT GAC GAG TCG ATC AAC CTG GAG	912
GAA GTT GAA CCC CAA TTG CAT CAG CAG TAA	942

【図面の簡単な説明】

【図1】ラットCD86とマウスCD86及びヒトCD86とのアミノ酸配列を対比させた図である。

【図2】ラットCD86抗体がラットCD86に反応することを示すFACSscanの結果の図である。

【図3】マイトジェン刺激によるラット脾細胞の増殖におけるラットCD86の影響と抗ラットCD86抗体の抑制効果を示す液体シンチレーションカウンター測定の結果を表すグラフである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

```

7CD86: ----- -MGLAILIFV TVLLISDAVS VETQAYFNGT AYLPCTPTKA QNISLSELVV
      * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
>|CD86: MYVVKTCVTC TMYLGILFSV LAYLLSDAVP VKRQAYFNST AYLPCTPTKA QNISPSELVV
      * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
<|CD86: M----- -GLSNILF-V MAFLLSGAAP LKIQAYFNET ADLPCQFANS QNQSLSELVV
      * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

50 : FWQDQQLVL YEHLGTEKL DSVNAKYLR TSFDNNWTL RLHNVIKDM GSYDCFIQKK
    * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
61 : FWQDRKKSVL YEHLGAELK DNVNAKYLR TSFDONQAL RLHNVIKDT GLYDCFIQKK
    * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
50 : FWQDQENLV NEVYLGEKF DSVHSKYMGR TSFDSDSWL RLHNLQIKDK GLYQCIIHHK
    * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .

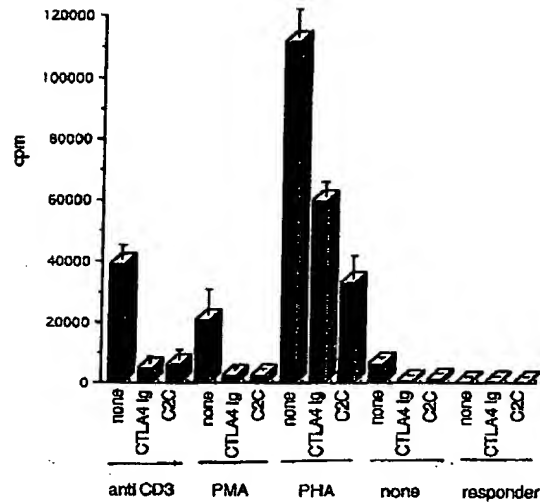
110 : PPTGSILLQQ TLTELIVIAN FSEPEIKLAQ NVTGNSSINL TCSSKGHPK PKKMYFL--I
     * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
121 : TPTGSILLQQ WETELIVIAN FSEPEIEEAQ NETRNTGINL TCSSKGYPK PTCKMYFL--I
     * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
110 : KPTGMIRIHQ MNSELIVLAN FSQPEIVPIS NITENVYINL TCSSIGHYPE PKKM SVLLRT
     * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
168 : TNSINEYGDN MQISQDNVTF LFSISNLSL SFPDGVMHT VCVLETESM KI-SSKPLN-
     * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
181 : TNSINEYGDN MQISQDNVTK LFSVISLSL PFPDGVNMT IVCILETESM NI-SSKPHNM
     * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
170 : KNSTLEYDGI MQKSQDNVTE LYDVVISLSV SFPDVTNMT IFCILETDKT RLLSSPFSIE
     * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
226 : FT-QEFPSPQ TYWKE-IT-A SVTVALLVM -LLIVCH-K KPNQPSRPSN TAS-KL----
     * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
241 : VFSQ----PQ FDRKTWIIQA GPSS-LLCL FLLVYKAVK KCLKMQNPQG RFSRNTC---
     * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
230 : LED-----PQ PPPDH-IPWI TAVLPTVIC WMVFCLIWK WKKKKRPRNS Y---K-CGTN
     * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .
276 : ----ER-DS NADRETINK ELEPQIASAK PNAE
     * . . . . . * . . . . . * . . . . .
300 : ----ESKQD SGVDSEINLE EVEPQLHQQ
     * . . . . . * . . . . .
281 : THEREESEQT KKR-EKIHIP ERSDEA-QRV FKSSKTSSCO KSOTCF
     * . . . . . * . . . . .

```

Two flow cytometry histograms are shown side-by-side. The left histogram is labeled 'CD86-CHO' and the right is labeled 'CHO'. Both have a y-axis labeled '300' and an x-axis with a logarithmic scale from 10^0 to 10^4 . The 'CD86-CHO' histogram shows a broad peak centered around $10^2.5$. The 'CHO' histogram shows a sharp peak centered around 10^1 .

THIS PAGE BLANK (USPTO)

【図3】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 H 21/04

C 0 7 K 16/18

C 0 7 K 16/18

C 1 2 P 21/02

C

C 1 2 N 5/10

21/08

15/02

G 0 1 N 33/58

15/09

Z N A

A 6 1 K 37/02

C 1 2 P 21/02

C 1 2 N 5/00

B

21/08

15/00

C

G 0 1 N 33/58

9282-4B

Z N A A

9282-4B

// (C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 八木田 秀雄

(72)発明者 奥村 康

東京都板橋区小豆沢三丁目9番2号610号

千葉県千葉市中央区松波一丁目14番9号

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)